Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 3, Fall 2019, p. 389-398

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 3، پاییز 1398، ص. 398-389

تنوع ژنتیکی خط پدری اسب‌های ایرانی با استفاده از توالی یابی بخشی از کروموزوم Y

نعمت هدایت ایوریق[1*]، رضا خلخالی ایوریق[2]، رضا سیدشریفی[1]، مصطفی عمری[3]

تاریخ دریافت: 1396/12/17
تاریخ پذیرش: 1397/09/05

چکیده

علیرغم وجود تنوع بالا در ژنوم میتوکندریایی و خط مادری، تنوع کمی در کروموزوم Y و خط پدری در اغلب پستانداران، از جمله اسب‌ها وجود دارد. تاکنون مطالعات کمی در زمینه شناسایی تنوع ژنتیکی در کروموزوم Y اسب‌ها در جهان صورت گرفته است. در مطالعه کنونی، از تعداد 53 اسب از شش جمعیت نژادی مختلف در ایران شامل شامل اسب‌های موجود در باشگاه‌های سوار کاری شهرستان اردبیل (24 نمونه)، اسب‌های بومی شمال‌غرب (باشگاه‌ها) (17 نمونه)، اسب‌های کردی (15 نمونه)، اسب‌های عرب (10 نمونه)، اسب‌های دره شوری (10 نمونه) و اسب‌های قره‌باغ (5 نمونه) نمونه‌گیری شده و برای شناسایی تنوع در کروموزوم Y قطعه 264 جفت بازی از طریق روش توالی‌یابی سانگر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که شش جایگاه متغیر در بین توالی‌ها وجود دارد که منجر به ایجاد نه هاپلوتایپ مختلف می‌شوند. از بین هاپلوتایپ‌های شناسایی شده، هاپلوتایپ دو (H-2) با در برگرفتن 15 نمونه، بزرگترین هاپلوتایپ محسوب شد. میانگین تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتایپی به ترتیب برابر با 0/0067 و 0/81 برآورد شد. هاپلوتایپ‌های یک (H-1) و دو (H-2) با در برگرفتن پنج نژاد از شش نژاد مورد مطالعه، متنوع‌ترین هاپلوتایپ‌ها بودند. اسب‌های عرب و دره‌شوری با فاصله ژنتیکی 0/00327 نزدیکترین نژادها و اسب‌های نمونه‌گیری شده از باشگاههای سوارکاری اردبیل و قره‌باغ با فاصله ژنتیکی 0/00822 دورترین نژادها نسبت به هم هستند. همچنین مشخص شد که برخلاف نژاد عرب، نژاد قره‌باغ دارای کمترین قرابت ژنتیکی پدری با اسب‌های ایرانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسب‌های ایرانی، تنوع ژنتیکی، خط پدری، کروموزوم Y، هاپلوتایپ.

مقدمه

در بین حیوانات اهلی شده، اسب را می‌توان یکی از تاثیر گذارترین موجودات در روند مدرن شدن زندگی بشر دانست. شواهد باستان شناسی نشان می‌دهد که حضور اسب در ایران به 3000 سال قبل از میلاد باز می‌گردد (11). بر اساس آمار موجود، امروزه حدود 140 هزار راس اسب در مناطق مختلف ایران وجود دارند (7). به دلیل تنوع اقلیمی در ایران، نژادهای گوناگونی در نواحی مختلف کشور وجود دارند که از این دست می‌توان به نژادهای ترکمن، کردی، دره شوری، عرب، اسب فلات ایران، سیستانی، اسبچه خزر و اسب‌های بومی شمالغرب کشور اشاره کرد.

نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند (23). به علاوه، در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد(16؛ 20 و 22). مطالعه تنوع ژنتیکی در میتوکندری و کروموزوم Y این امکان را فراهم نموده تا به ترتیب به ریشه‌یابی خط پدری و مادری اسب‌های مختلف دنیا پرداخته شود. علیرغم تنوع زیادی که تاکنون در ژنوم میتوکندری اسب‌ها گزارش شده (2؛ 9 و 19)، اما این تنوع در جایگاه‌های مختص نرها در کروموزوم Y ناچیز می‌باشد (3) و مطالعات کمی در مورد شناسایی تنوع‌های موجود در کروموزوم Y صورت گرفته است. از دلایل پایین بودن تنوع در کروموزوم Y می‌توان به کم بودن تعداد جمعیت موثر نرها (به دلیل رفتارهای ویژه تولید مثلی) و گذر از چندین تنگنای جمعیتی در اوایل دوران اهلی‌سازی اسب‌ها اشاره کرد (25). علاوه بر دلایل اشاره شده، تنوع در کروموزوم Y اسب‌های مدرن به علت تنظیم برنامه‌های اصلاحی شدید و تجارت گسترده اسب‌های خاص رو به کاهش می‌باشد. علیرغم پایین بودن میزان تنوع در کروموزوم

1- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
2- دانش آموخته کارشناسی ارشدعلوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
3- دانش آموخته دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح دام
(* - نویسنده مسئول: nhedayat@uma.ac.ir)
Doi:10.22067/ijasr.v11i3.71507

Y در نژادهای برتر جهان (13)، مطالعه‌ای بر روی نژادهای بومی اسب چینی (14)، منجر به شناسایی تنوعی در نواحی مورد مطالعه شد. این نتایج می‌تواند نمایانگر این امر باشد که شناسایی تنوع در نژادهای بومی که وارد روند اصلاحی شدیدی نشده‌اند، دور از انتظار نیست. یکی از مطالعاتی که در زمینه شناسایی تنوع در کروموزوم Y صورت گرفته، مطالعه فونتس و همکاران (3) می‌باشد که بر روی جمعیت اسب‌های وحشی ریتوراتس[1] در اسپانیا انجام پذیرفت. در این مطالعه، از تعداد 6 اسب ریتوراتس و 40 اسب نر از 11 نژاد دیگر برای بررسی شش جایگاه در کروموزوم Y استفاده شد. مقایسه توالی‌های اسب‌های ریتوراتس با 11 نژاد دیگر نشان داد که هیچ گونه تفاوتی بین این توالی‌ها وجود ندارد و لذا هیچ تنوعی در این شش جایگاه در بین 12 نژاد مورد بررسی مشاهده نشد. در زمینه شناسایی تنوع در کروموزوم Y مطالعه‌ای دیگر بر روی اسب‌های بومی چین صورت پذیرفت (8). این مطالعه بر روی 304 اسب بومی چین (13 نژاد) و در 33 جایگاه مختلف کروموزوم Y انجام گرفت. نهایتا در 2 جایگاه (Y-45701/997 و Y-50869) تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) مشاهده شده و در یک جایگاه دیگر (Y-45288) نیز یک حذف[2] تک نوکلئوتیدی (حذف باز T) گزارش شد. جهش موجود در جایگاه Y-50869 (T>A) با فراوانی 24/67 دارای بیشترین فراوانی در میان جهش‌های شناسایی شده بود. با استفاده از جهش‌های شناسایی شده، 5 هاپلوتایپ در اسب‌های چینی گزارش شد.

اطلاعات فنوتیپی و داده‌های شجره‌ای به تنهایی، منابع کافی برای تعیین تاریخ و منشاء نژادهای اسبی به شمار نمی‌آیند. در کنار اطلاعات فنوتیپی، مطالعات مولکولی و ژنتیکی اطلاعات کافی و قابل اعتمادی را در اختیار ما قرار می‌دهند. این دست مطالعات، به همراه دیگر ابزارهای اصلاحی می‌توانند راهکارهای مدیریتی کارآمدی در زمینه مدیریت منابع ژنتیکی (در موجودات گوناگون) را پیش روی ما قرار دهند. به همین دلیل در این تحقیق مطالعه‌ای جهت شناسایی تنوع در کروموزوم Y در چندین نژاد اسب ایرانی پرداخته شد تا با شناختی بهتر از ترکیب ژنتیکی اسب‌های ایرانی و میزان تاثیرگذاری دیگر اسب‌های جهان بر نژادهای ایرانی به دیدی بهتر در مورد این حیوانات در کشور نائل آییم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

برای اجرای این تحقیق، از تعداد 81 اسب متعلق به جمعیت‌های نژادی مختلف کشور شامل اسب‌های موجود در باشگاههای سوار کاری شهرستان اردبیل (24 نمونه)، اسب‌های بومی شمال‌غرب (باشگاه‌ها) (17 نمونه)، اسبهای کردی (15 نمونه)، اسبهای عرب (10 نمونه)، اسبهای دره شوری (10 نمونه) و اسبهای قره‌باغ (5 نمونه) نمونه خون استحصال شد. کلیه نمونه‌های خون از سیاهرگ گردنی اسب‌ها به مقدار 4 میلی‌لیتر تهیه شد و در یک تیوب حاوی EDTA (1 mg/ml) تا زمان استخراج در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شد. کل محتوای DNA با استفاده از روش کیت استخراج DNA از خون پستانداران شرکت Exgene Cell SV kit (GENEALL Biotechnology co, LTD, Republic of Korea) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل اگارز 0/8درصد در دستگاه الکتروفروز سنجیده شد.

انتخاب آغازگر، تکثیر و توالی‌یابی جایگاه

با توجه به اینکه مطالعات مختلف نشان می دهند که تنوع چندانی در کروموزوم y وجود ندارد و در فقط در بخشی از مناطق چندشکلی مشاهده شده است لذا در این مطالعه، از یک جفت آغازگر رفت و برگشت اختصاصی برای تکثیر قطعه مورد نظر (Y-50869) بر روی کروموزوم Y اسب‌های نمونه‌گیری شده، استفاده گردید. پرایمر مدنظر (شماره دسترسی در Genbank: JX646950) دارای طول 20 نوکلئوتید و دمای ذوب 58 درجه سانتیگراد بوده و قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول 264 باز می‌باشد (24). توالی آغازگر به شرح زیر می‌باشد.

F (5’-GGCCTAAGTTGTTCGCAGAG-3’)
R (5’-TGACTGGTGGTGTCCAGTGT-3’)

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم‌های 25 میکرولیتری، حاوی 1/2 میلی مولار $MgCl_2$، 0/2 میلی مولار dNTP، 1/5 واحد آنزیم Taq پلیمراز ، 0/15 پیکومولار از پرایمرهای رفت و برگشت و 100 نانوگرم DNA انجام شدند. تمام واکنش های PCR با استفاده از برنامه استاندارد شامل 10 دقیقه واسرشت سازی آغازین در دمای 95 درجه سانتیگراد ،30 سیکل شامل 30 ثانیه واسرشت سازی در 94 درجه سانتیگراد،50 ثانیه در دمای اتصال 62 درجه سانتیگراد و30 ثانیه در 72 درجه سانتیگراد بسط اولیه اجرا شد و در نهایت تکثیر نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتگراد انجام گرفت. درنهایت، محصولات PCR پس از بررسی در ژل اگارز 1/5 درصد با استفاده از روش سانگر از طریق شرکت پیشگام بیوتکنولوژی بصورت یک طرفه و از سمت رفت توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی‌ها

در گام نخست، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.6.5 تعیین کیفیت شده سپس با استفاده MEGA 6.0 (21) همردیف شده و تعداد جایگاه‌های متفاوت (S) مشخص شدند. همچنین با استفاده از

1- Retuerats
2- deletion

برنامه MEGA 6.0 و الگوریتم حداکثر درستنمایی[1]، درخت فیلـوژنی مربوط به هاپلوتایپ‌های مختلف رسم گردید. در گـام بعـدی، بـرای محاسبه تنوع نوکلئوتیدی (π)، تنوع هاپلوتایپی (H_d)، میانگین تعـداد تفـاوت‌هـای نوکلئوتیـدی (k) و همچنـین فواصـل ژنتیکـی بـین جمعیت‌های نژادی مختلف، از نسخه 5 نرم‌افزار DnaSP (12) استفاده شد. در نهایت، جهت آنالیز شبکه‌ای هاپلوتایپ‌های به دست آمـده، از نسخه 5 نـرم‌افـزار Network (www.fluxus-engineering.com) استفاده شد.

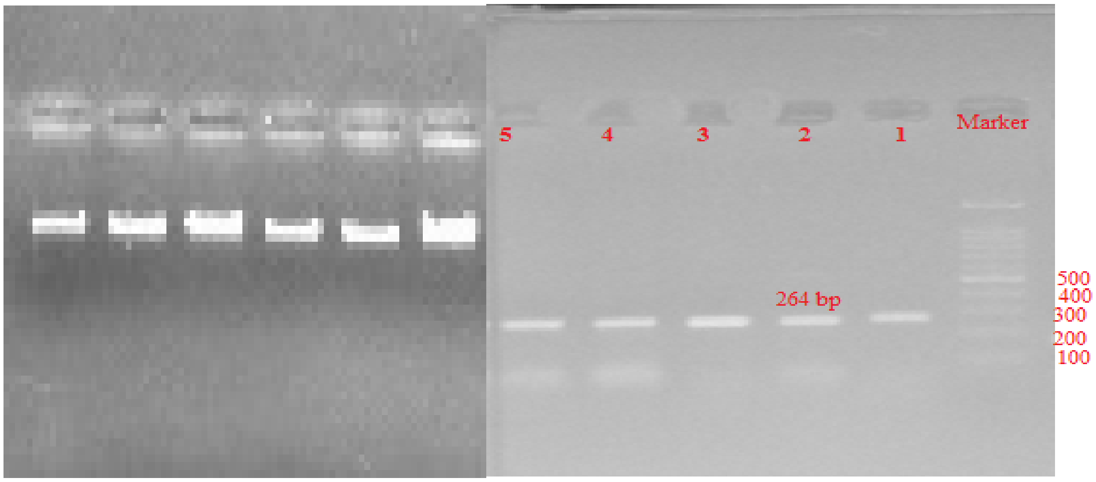
نتایج و بحث

همـانطور کـه مشـاهده مـی شـود اسـتخراج DNA و تکثیـر محصولات PCR با کیفیت مناسب انجـام گردیـد (شـکل 1) سـپس توالی یابی شد (شکل 2). بعد از همردیفی و اصلاح توالی‌های بدست آمده، تعداد شش جایگاه نوکلئوتیدی متغیر، منجـر بـه شناسـایی نـه هاپلوتایپ در ناحیه تکثیر شده کروموزوم y در اسب‌های مورد مطالعه شد. از شش جایگـاه متغیـر دو جایگـاه مربـوط بـه جـایگزینی‌هـای تک‌نوکلئوتیدی سینگلتون و چهار جایگاه نیز مربوط به جایگزینی‌های تک‌نوکلئوتیدی پارسیمونی بودند. در یک مطالعه بر روی 49 راس از نریان کاباردیان[2] نیز شش جهش گزارش شده است و نشان دادند که از سه هاپلوتیپ اصلی تشکیل شده است و نقـش اسـبهای عربـی در ایجاد این نژاد نیز معنی دار بود (1) مقادیر میانگین تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتایپی برای کل نمونه‌ها به ترتیب برابر با 0/0067 و 0/81 بود. در مطالعه‌ای توسط مریدی و همکاران (17) بر روی اسـب‌هـای بومی ایران (شامل نژادهای عرب، ترکمن، خـزر، سیسـتانی و کـرد)، مقدار میانگین تنوع نوکلئوتیدی بر پایه تـوالی D-loop میتوکنـدری برابر با 0/02 گزارش شد. در مطالعه‌ای دیگر نیز کـه توسـط هـدایت ایوریق و همکـاران (9) بـر روی تـوالی D-loop میتوکنـدری شـش جمعیت نژادی مختلف از اسب‌های ایران صورت گرفت، مقادیر تنـوع نوکلئوتیدی اسب‌های مورد مطالعه، در محدوده 0/0172 تـا 0/0242 گزارش شد. مقایسه مقدار تنوع نوکلئوتیدی در خـط پـدری (مطالعـه حاضر) با مقادیر گزارش شده برای خط مادری اسـب‌هـای ایرانـی در مطالعات مذکور، نشان دهنده تنوع بالا در خط مادری در مقایسـه بـا خط پدری اسب‌های ایرانی می‌باشد. یکی از دلایل این امر را می‌توان به تعداد جمعیت موثر کم نرهای پستانداران اهلی (15) و از آن جمله اسب‌ها نسبت داد. تنوع نوکلئوتیـدی و هاپلوتـایپی بدسـت آمـده در تحقیق حاضر از مقادیر گزارش شده برای نژادهای اسب‌هـای چینـی (تنوع نوکلئوتیدی 0/00044 و تنوع هاپلوتایپی 0/402) بیشتر بود (8).

نتایج آنالیز قطعه 264 جفت بازی از کروموزم y نشان داد که در بین اسب‌های مورد مطالعه، اسب‌های نمونه‌گیری شده از باشگاههای سوارکاری اردبیل با قرار گرفتن در هشت هاپلوتایپ مختلف، بیشترین پراکندگی را نشان دادند. اسب‌های قره‌باغ و عرب نیز در دو هاپلوتایپ مختلف قرار گرفتند که می‌تواند به دلیل تعداد کم نمونه‌های مربوط به این نژادها باشد. هاپلوتایپ‌های شـش، دو و یـک بـه ترتیـب بـا در برگرفتن 25 (30/86 درصد کل اسـب‌هـا)، 23 (28/39 درصـد کـل اسب‌ها) و 17 (20/99 درصد کل اسب‌ها) اسب، دارای بیشترین تعداد افراد بودند که می توان بعنوان اصـلی تـرین هاپلوتیـپ خـط پـدری اسبهای مـورد مطالعـه معرفـی کـرد، در حالیکـه هـر کـدام از چهـار هاپلوتایپ پنج، هفـت، هشـت و نـه فقـط دارای یـک فـرد بودنـد. هاپلوتایپ‌های یک، دو و شش نیز هر کدام با داشتن پنج نژاد از شش نژاد مختلف، دارای بیشترین تنوع از این جهت بودنـد (جـدول 1). در بین هاپلوتایپ‌هـای بـا تعـداد بـیش از یـک فـرد، هـیچ هاپلوتایـپ اختصاصی برای هیچ‌کدام از نژادها وجود نداشت. بررسی شبکه به‌هـم پیوسته هاپلوتایپ‌ها نشان داد که هاپلوتایپ‌های ایجاد شده در واقـع اختلاطی از نژادهای مختلف می‌باشند که این نتیجه می‌تواند به علت تاثیر نرهای نژادهای مختلف در جمعیت نژادهای دیگر باشـد (شـکل 3). میزان هاپلوتیپ بالا در جایگاههای کروموزومy در بز (4) مشاهده شده است ولی در گاوهای شیری میزان هاپلوتیـپ کمتـری گـزارش شده است (5). در یک مطالعه ای با بررسی جایگاه ژنـی موجـود بـر روی کروموزوم y در اسبهای ژاپن دو جایگاه چندشکلی را شناسـایی کردند که در سه هاپلوتیپ قرارگرفتند (10). براساس مطالعات انجـام گرفته و نتایج این مطالعه به نظر می رسد سه هاپلوتیپ اصلی در خط پدری اسب های آسیایی وجود دارد.

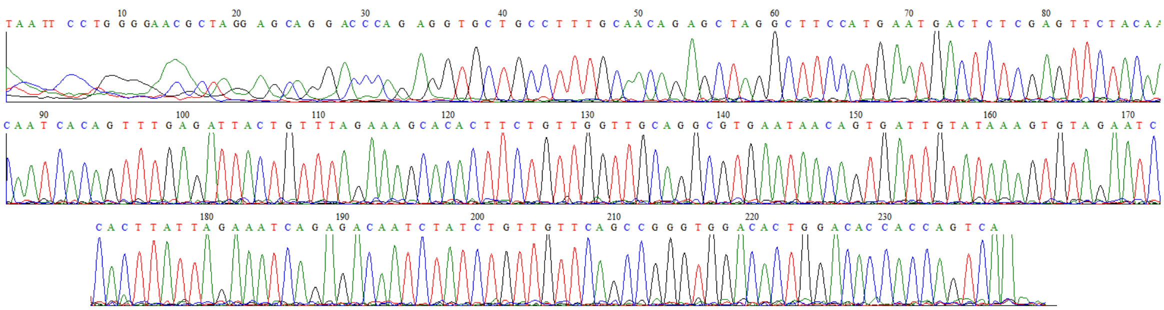
توالی‌های مربوط به اسب‌های نمونه‌گیـری شـده از باشـگاههای سوارکاری اردبیـل دارای پـنج جایگـاه متغیـر بودنـد کـه منجـر بـه شکل‌گیری هشت هاپلوتایپ در بین این اسب‌ها شد. نژاد کردی نیز با چهار جایگاه متغیر و شش هاپلوتایپ در جایگاه بعدی قرار گرفت. نژاد قره‌باغ علیرغم تعداد کم نمونه، سه جایگاه متغیـر و دو هاپلوتایـپ را نشان داد که مطالعه این نژاد با تعداد بالاتر نمونه می‌تواند در تائید یا رد تنوع بالا، کمک کننده باشد. در این مطالعه، بیشـترین و کمتـرین تنوع هاپلوتایپی به ترتیب مربوط به اسب‌های کردی (0/86) و عرب (0/6) بود. در بین نژادهایی که پنج نمونه یا بیش از پنج نمونه داشتند، اسب‌های اردبیل با تنوع نوکلئوتیدی برابـر بـا 0/00827 دارای تنـوع بالایی بودند و نژاد عرب نیز پایین‌ترین تنوع نوکلئوتیدی (0/00288) را نشان داد (جدول 2). تنوع پایین در نژاد عرب می‌تواند به این دلیل باشد که علیرغم تاثیر بالای نرهای این نژاد بر نژادهای دیگر، بـرای بهینه‌سازی نژاد عرب، از نرهای نژادهای ایرانی اسـتفاده نشـده و یـا استفاده کمی شده است. در بین نژادهای ایرانی، نژاد دره‌شوری دارای کمتـرین تنـوع نوکلئوتیـدی (0/00481) و هاپلوتـایپی (0/8) بـود. اطلاعات کم در مورد شجره اسب‌های ایرانی باعث شده تا بحـث در مورد چرایی نتایج بدست آمده دارای محدودیت‌های باشد.

1- Maximum likelihood
2- Kabardian horse



شکل 1- تصویر DNA استخراج شده و تکثیر قطعه 264 جفت بازی کروموزوم Y در اسب های ایرانی

Figure 1. Extracted DNA (Right) and amplification of 264 bp seqgment of chromosome Y (Left) in Iranian horses.



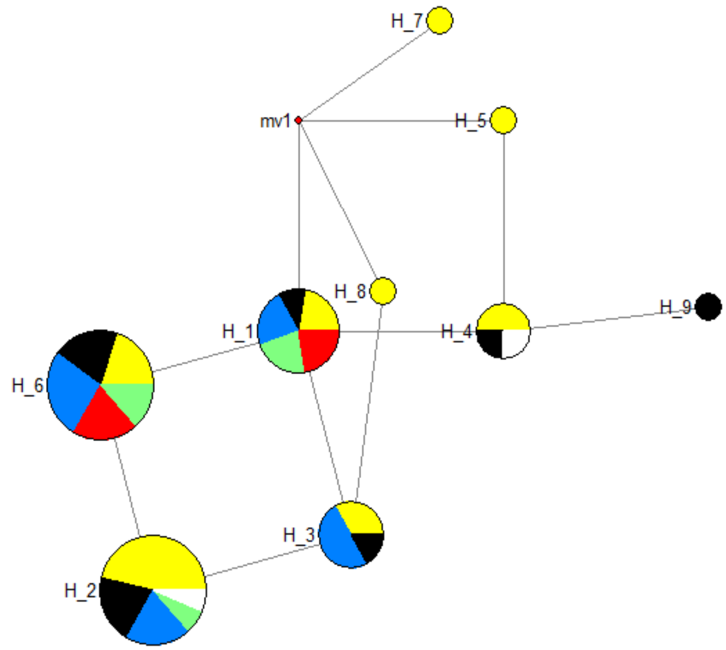
شکل2- کروماتوگرام توالی های بدست آمده از توالی یابی سانگر برای بخشی از کروموزوم Y در اسب

Figure 2- chromatogram of sequences from Sanger sequencing of partial chromosome Y in horses.

جدول 1- تعداد و فراوانی هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در نژادهای اسب مورد مطالعه

Table 1- Number and frequency of identified haplotypes in under study horses

نژادها Breeds	تعداد Number	Hap 1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7	Hap 8	Hap 9
اردبیل Ardebil	24	4 (0.17)	9 (0.38)	2 (0.08)	2 (0.080)	1 (0.04)	4 (0.17)	1 (0.04)	1 (0.04)	0
شمالغرب Northwest	17	3 (0.17)	4 (0.24)	4 (0.24)	0	0	6 (0.35)	0	0	0
کردی Kordi	15	2 (0.13)	5 (0.33)	1 (0.07)	1 (0.07)	0	5 (0.33)	0	0	1 (0.07)
دره‌شوری Darehshuri	10	4 (0.4)	2 (0.2)	0	0	0	4 (0.4)	0	0	0
عرب Arab	10	4 (0.4)	0	0	0	0	6(0.6)	0	0	0
قره‌باغ Qarebagh	5	0	3 (0.6)	0	2 (0.4)	0	0	0	0	0
کل Total	81	17	23	7	5	1	25	1	1	1



شکل 3- شبکه به‌هم‌پیوسته هاپلوتایپ‌های مربوط به کروموزوم Y در اسب‌های اردبیل (زرد)، شمالغرب (آبی)، کردی (سیاه)، دره‌شوری (سبز)، عرب (قرمز) و قره‌باغ (سفید)

Figure 3- A median-joining haplotype network for Ardebil (Yellow), Northwest (Blue), Kordi (Black), Drehshuri (Green), Arab (Red) and Qarebagh (White) horses based on Y chromosome.

جدول2- تنوع ژنتیکی در اسب‌های اردبیل، شمالغرب، کردی، دره‌شوری، عرب و قره‌باغ بر اساس کروموزوم Y

Table 2- Genetic variation in Ardebil, Northwest, Kordi, Drehshuri, Arab and Qarebagh based on Y chromosome

نژادها Breeds	جایگاه‌های متنوع Segregating sites (S)	تعداد هاپلوتایپ Haplotype number (h)	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide diversity (π)	تنوع هاپلوتایپی Haplotype diversity (H_d)	میانگین تعداد تفاوت‌ها Average number of diffrences (k)
اردبیل Ardebil	5	8	0.00827	0.8421	1.71
شمالغرب Northwest	2	4	0.00517	0.8030	1.07
کردی Kordi	4	6	0.0078	0.8667	1.62
دره‌شوری Drehshuri	2	3	0.00481	0.8	1
عرب Arab	1	2	0.00288	0.6	0.6
قره‌باغ Qarebagh	3	2	0.01442	0.65	3

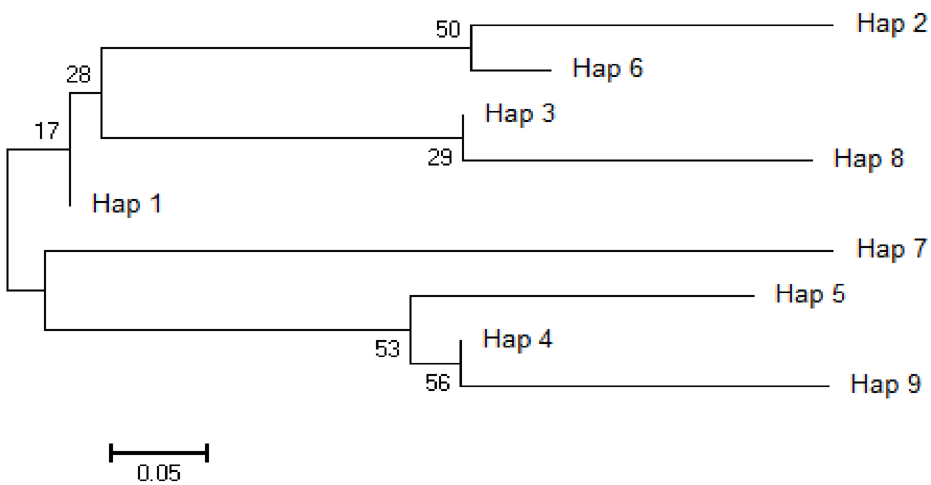
بررسی فواصل ژنتیکی (Dxy) بین جمعیت‌های نـژادی مختلـف اسب‌های تحت مطالعه، نشـان داد کـه بیشـترین و کمتـرین فاصلـه ژنتیکی خط پدری براساس جایگاه تکثیر شده ناحیه کروموزوم y بـه ترتیب متعلق به اسـب‌هـای اردبیـل-قـره‌بـاغ (0/00822) و عـرب-دره‌شوری (0/00327) می‌باشد (جدول 3). هرچند به نظر مـی‌رسـید، اسب‌های نمونه‌گیری شده از باشگاه‌های سوارکاری اردبیل بـه دلیـل نزدیکی جغرافیایی، دارای قرابت ژنتیکی بیشتری با اسب‌های قره‌باغ باشند، اما شواهد نشان می‌دهد که پرورش دهندگان اسب، اسب‌هـای خود را از نواحی مختلف خریداری کرده‌اند. احتمالا نریان‌های استفاده شده برای باروری در باشگاههای سوار کـاری اردبیـل را نمـی‌تـوان

بومی این شهرستان دانست. پراکنش اسب‌های نمونه‌گیری شده از اردبیل در هاپلوتایپ‌های مختلف نیز دلیلی بر این ادعا می‌باشد. نتایج آنالیز فاصله ژنتیکی براساس نواحی D-LooP میتوکندریای نشان می دهد که فاصله ژنتیکی کمتری بین اسب های موجود در باشگاههای سوار کاری اردبیل با اسب های بومی شمالغرب دارد که می توانند نشان دهند استفاده از مادیان بومی جهت تکثیر اسب های ممتاز در باشگاهها باشد. (18) بررسی فواصل ژنتیکی نزدیک بین اسب‌های عرب با نژادهای دره‌شوری (0/00327)، شمالغرب (0/00473) و کردی (0/00567) در مقایسه با فواصل ژنتیکی بین نژادهای دیگر نشان از تاثیر نرهای نژاد عرب در اسب‌های ایرانی دارد. تاثیر بالای نژاد عرب در اسب‌های اصیل اروپایی از جمله نژاد تروبرد نیز به خوبی ثابت شده است (6) به طوریکه تمامی نرهای برتر تروبرد در انگلستان، از فرزندان سه نر برتری هستند که دو راس از آنها متعلق به نژاد عرب می‌باشند، این اسب‌ها در اواخر قرن 18 تا اواخر قرن 19 وارد اروپا شده‌اند (24). برخلاف نژاد عرب، نژاد قره‌باغ دارای کمترین قرابت ژنتیکی پدری با اسب‌های ایرانی می‌باشد. اسب‌های نمونه‌گیری شده از اردبیل، نزدیکترین فاصله ژنتیکی را در ارتباط با اسب‌های بومی شمالغرب نشان دادند (0/00656). ارتباط نزدیک و فاصله ژنتیکی پایین براساس ناحیه تکثیر شده کروموزوم y بین اسب‌های شمالغرب و دره‌شوری نیز از نتایج جالب توجه در این مطالعه به شمار می‌رود. با توجه به جدایی جغرافیایی بین اسب‌های شمالغرب (پراکنش در شمالغرب) و دره‌شوری (پراکنش اصلی در استان فارس) به نظر می‌رسد، با توجه به خصوصیات ظاهری نژاد دره‌شوری و شباهت آن به اسب عرب، پرورش دهندگان اسب، بعد مسافت را از میان برداشته و بین این دو نژاد، اختلاط ژنتیکی ایجاد کرده‌اند.

جدول 3- فاصله‌های ژنتیکی (Dxy) محاسبه شده بین نژادهای اسب تحت مطالعه

Table 3- Estimated genetic distances (Dxy) among under study horse breeds

	اردبیل Ardebil	شمالغرب Northwest	کردی Kordi	عرب Arab	دره‌شوری Drehshuri	قره‌باغ Qarebagh
اردبیل Ardebil	-	0.00656	0.00772	0.00668	0.00663	0.00822
شمالغرب Northwest	-	-	0.00617	0.00473	0.00473	0.00721
کردی Kordi	-	-	-	0.00567	0.00587	0.00769
عرب Arab	-	-	-	-	0.00327	0.00721
دره‌شوری Drehshuri	-	-	-	-	-	0.00721



شکل 4- درخت فیلوژنی بین شش نژاد اسب بر اساس نه هاپلوتایپ شناسایی شده

Figure 2- Phylogeny tree among six horse breeds based on nine identified haplotype

درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس نه هاپلوتایپ از قطعه 264 جفت بازی تکثیر شده کروموزوم Y در شکل 4 ارائه شده است. درخت مذکور به طور کلی به دو شاخه اصلی تقسیم‌بندی می‌شود که در شاخه اول پنج هاپلوتایپ (یک، دو، سه، شش و هشت) و در شاخه دوم نیز چهار هاپلوتایپ (چهار، پنج، هفت و نه) وجود دارند. تعداد 73 اسب که شامل 90/12 درصد از کل نمونه‌ها می‌شود، در شاخه اول و 8 نمونه (9/88 درصد از کل نمونه‌ها) نیز در شاخه دوم قرار دارند.

نتیجه‌گیری کلی

هر چند این تحقیق را نمی‌توان کامل ارزیابی کرد، اما شروعی است برای راهی که می‌تواند اطلاعات جامع و کاربردی را در اختیارمان قرار دهد. به نظر می‌رسد وجود اطلاعات شجره‌ای دقیق برای اسب‌های ایرانی در کنار مطالعات ژنتیکی می‌تواند در تقسیم‌بندی بهتر این حیوانات کمک کننده باشد. تقسیم‌بندی و شناخت دقیق جمعیت‌های اسب در ایران می‌تواند در زمینه طراحی استراتژی‌های اصلاحی کارآمد، موثر باشد.

منابع

1- Ali-Bek, D. K., A. S. Duduev, Z. A. Kokov, K. K., Amshokov, M. K. Zhekamukhov, A. M. Zaitsev, and M. Reissmann. 2018. Genetic analysis of maternal and paternal lineages in Kabardian horses by uniparental molecular markers. Open Veterinary Journal, 8: 40-46.

2- Bigi, D., G. Perrotta, and P. Zambonelli. 2014. Genetic analysis of seven Italian horse breeds based on mitochondrial DNA D-loop variation. Animal Genetics, 45(4): 593-595.

3- Brandariz-Fontes, C., J. A. Leonard, J. L. Vega-Pla, N. Backström, G. Lindgren, S. Lippold, and C. Rico. 2013. Y-chromosome analysis in retuertas horses. PloS One, 8(5): p.e64985.

4- Cinar Kul, B., N. Bilgen, J. A. Lenstra, O. Korkmaz Agaoglu, B. Akyuz, and O. Ertugrul. 2015. Y-chromosomal variation of local goat breeds of Turkey close to the domestication centre. Journal Of Animal Breeding and Genetics, 132(6):449-453.

5- Correia, P. B. C., E. E. Baron, J. F. M. d. Silva, and Ó. C. Gardyn. 2017. Mitochondrial and Y chromosome genetic diversity in the Portuguese Lidia bovine breed. Revista Brasileira de Zootecnia, 46(2):99-104.

6- Cunningham, E. P., J. J. Dooley, R. K. Splan, and D. G. Bradley. 2001. Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. Animal Genetics, 32(6): 360-364.

7- FAOSTAT., 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Available at www.fao.org/faostat/en/#data/QA.

8- Han, H., Q. Zhang., K. Gao., X. Yue., T. Zhang., R. Dang., X. Lan., H. Chen, and C. Lei. 2015. Y-Single Nucleotide Polymorphisms Diversity in Chinese Indigenous Horse. Asian-Australasian journal of Animal Sciences, 28(8): 1066-1074.

9- Hedayat-Evrigh, N., M. Omri, A. Boustan, R. Seyedsharifi, and V. Vahedi. 2018. Genetic diversity and structure of Iranian horses' population based on mitochondrial marker. Journal of Equine Veterinary Science, 64:107-111.

10- Kakoi, H., T. Tozaki, M. Kikuchi, K. Hirota, S. Nagata, and M. Takasu. 2016. P4017 Distribution of Y chromosomal haplotypes in Japanese native horse populations. Journal of Animal Science, 94: 86-87.

11- Khalili, M. 2009. Horses and my expertise, Page 694. Nashr-e Zarre Publication, Iran.

12- Librado, P, and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25(11): 1451-1452.

13- Lindgren, G., N. Backström, J. Swinburne, L. Hellborg, A. Einarsson, K. Sandberg, G. Cothran, C. Vilà, M. Binns, and H. Ellegren. 2004. Limited number of patrilines in horse domestication. Nature Genetics, 36(4): 335-336.

14- Ling, Y., Y. Ma, W. Guan, Y. Cheng, Y. Wang, J. Han, D. Jin, L. Mang, and H. Mahmut. 2010. Identification of Y chromosome genetic variations in Chinese indigenous horse breeds. Journal of Heredity, 101(5): 639-643.

15- Lippold, S., M. Knapp, T. Kuznetsova, J. A. Leonard, N. Benecke, A. Ludwig, M. Rasmussen, A. Cooper, J. Weinstock, E. Willerslev, and B. Shapiro. 2011. Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. Nature Communications, 2: 450.

16- Moghadaszadeh, M., M. R. Mohammadabadi, and A. K. Esmailizadeh. 2015. Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. Genetics in the 3rd Millennium, 13(3): 4062-4067.

17- Moridi, M., A. A. Masoudi, R. Vaez Torshizi, and E. W. Hill. 2013. Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. Animal Genetics, 44(2): 209-213.

18- Omri, M. 2017. Investigation of genetic structure in native horses' population using mitochondrial marker in North-west of Iran. Master of Science Thesis in university of Mohaghegh Ardabili (in Persian).

19- Othman, O. E., K. F. Mahrous, and H. I. Shafey. 2017. Mitochondrial DNA genetic variations among four horse

populations in Egypt. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(2): 469-474.
20- Shamsalddini, S., M. R. Mohammadabadi, and A. K. Esmailizadeh. 2016. Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. Russian Journal of Genetics (Genetika), 52 (4): 461–465.
21- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725-2729.
22- Tohidi nezhad, F., M. R. Mohammadabadi, A. K. Esmailizadeh, and A. Najmi Noori. 2015. Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Journal of Agricultural Biotechnology, 6 (4): 35-50 (In Farsi).
23- Vajed Ebrahimi, M.T., M. R. Mohammadabadi, and A. K. Esmailizadeh. 2017. Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. Archiv fuer Tierzucht, 60: 183-189
24- Wallner, B., C. Vogl, P. Shukla, J. P. Burgstaller, T. Druml, and G. Brem. 2013. Identification of genetic variation on the horse y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds. PLoS One, 8(4): p.e60015.
25- Warmuth, V., A. Eriksson, M. A. Bower, G. Barker, E. Barrett, B. K. Hanks, S. Li, D. Lomitashvili, M. Ochir-Goryaeva, G. V. Sizonov, and V. Soyonov. 2012. Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109 (21): 8202-8206.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 3, Fall 2019, p. 389-398

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 3، پاییز 1398، ص. 398-389

Genetic Diversity in Paternal Line of Iranian Horses Using Partial Sequencing of Chromosome Y

N. Hedayat Evrigh[1]*, R. Khalkhali Evrigh[2], R. Seyedsharifi[1], M. Omri[3]
Received: 08-03-2018
Accepted: 26-11-2018

Introduction Among domesticated animals, the horse can be considered as one of the most influential animals in the process of human life modernization. Based on archaeological evidence, the presence of horses in Iran goes back to 3000 BC. Today, over 300 horses are recognized worldwide and a great number that is indigenous to Iran. The statistics provided by FAOSTAT indicate that there are about 140,000 horses. Due to climate diversity in Iran, there are various horse breeds in different parts of the country, such as Turkmen, Kordi, Drehshuri, Arab, Sistani, Northwest native and Caspian horses. Study of variations in Y chromosome and mtDNA make it possible to the characterization of genetic diversity in the maternal and paternal lines, respectively. Despite the high diversity in the genome of mitochondria in horses, but variation in Y chromosome is in low level. Low variation in Y chromosome of horses can be due to small male effective population size and loss of variations due to bottleneck during domestication. Several studies on Chinese indigenous and European modern horses revealed that native horses have more Y chromosomal variation in compared with modern breeds. So, the aim of present study was an assessment of genetic diversity in paternal line of Iranian horses using Y chromosome. Identified the genetic structure is important for appropriate breeding programs.

Material and Methods Blood samples were collected from Jugular vein using 4 ml tubes containing EDTA (1 mg/ml) of 81 horse belonging to six different populations including Ardebil's stables horses (24 samples), Northwest horses (17 samples), Kordi horses (15 samples), Arab horses (10 samples), Darehshuri horses (10 samples) and Qarebagh horses (5 samples). Total genomic DNA was extracted from whole blood. A total of the 264-bp fragment (locus: Y-50869) of Y chromosome was amplified using a pair of 20-nucleotide primer (Genbank accession number: JX646950). Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out and then, products of PCR sequenced using Sanger sequencing method. Alignment of sequences was performed by MEGA 6.0 software. Also, MEGA 6.0 used for segregating sites identification and also phylogeny tree construction based on identified haplotypes. DnaSP5 was used to the estimation of haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π), genetic distance (Dxy) and an average number of differences (k). Finally, the median-joining network was generated using the Network 5 program to present the possible relationships among haplotypes.

Results and Discussion Alignment of sequences led to the identification of six segregating sites and consequently nine haplotypes based on Y chromosome sequences. Three haplotypes (H_1, H_2, and H_6) are widely distributed among under study samples, so that, 65 of 81 (more than 80 %) individuals have placed in three haplotypes. Among haplotypes with more than one individual, there is no special haplotype for any of breeds. Haplotype diversity values ranged from 0.6 for Arab breed to 0.86 for Kordi breed. The nucleotide diversity values ranged from 0.00288 for Arab breed to 0.01442 for the Qarebaghg breed. Average values for nucleotide diversity and haplotype diversity were 0.0067 and 0.81 respectively. Comparison of present results with the previous study on mtDNA diversity of Iranian horses revealed that maternal line of Iranian horses is more divers from paternal line. Among Iranian breeds, Dareshuri breed has the lowest nucleotide diversity 0.00481 and haplotype diversity 0.00481 and 0.8 respectively. Assessment of genetic distance among breeds revealed that Ardebil and Qarebagh horses have the highest distance (0.00822), while Arab and Dareshuri horses showed the lowest genetic distance (0.00327). Obtained results indicated that, unlike Arab breed, Qarebagh horses had low influence in Iranian horses. Phylogeny tree based on haplotypes of Iranian horses showed that

1-Departmetn of Animal Science, Fcaulty of Agriculture and natural resource, University of Mohaghegh Ardabili
2-MSC graduated student of Animal Science, Fcaulty of Agriculture and natural resource, university of Mohaghegh Ardabili
3-PhD graduated of Genetic and Animal Breeding
(*-Corresponding Author Email: nhedayat@uma.ac.ir)

divided into two branches. Generally, 73 individual (90.12% of all horses) and 8 individuals (9.88% of all samples belongs to each of the two branches.

Conclusion The number of haplotypes which was found for Iranian native horses was placed among three haplogroups, which indicate moderate genetic variety and numerous maternal lines in native horses of Iran. It seems that the presence of the accurate pedigree information along genetic studies can help us to better categorize Iranian horses. In fact, to designing effective breeding strategies, we need to identify the precise genetic structure of Iranian horses. What we learned from this study was that Iranian horses in compared with European pure breeds are more diverse. Obtained results from this study showed that Stalions of Arab breed had high impact in Iranian horses.

Key words: Genetic diversity, Haplotype, Iranian horses, Paternal line, Y chromosome.